

DNA MARKER PLACED CLOSELY TO RICE CYTOPLASMIC MALE STERILITY-RESTORING GENE AND DISCRIMINATION OF CYTOPLASMIC MALE STERILITY-RESTORING GENE BY USE OF THE SAME

Patent number: JP2000139465
Publication date: 2000-05-23
Inventor: INAGAKI AKIKO; YOKOZEKI SUKEYOSHI; AKAGI HIROMORI
Applicant: MITSUI CHEMICALS INC
Classification:
- international: C12N15/09; C12Q1/68
- european:
Application number: JP19980315985 19981106
Priority number(s): JP19980315985 19981106

[Report a data error here](#)**Abstract of JP2000139465**

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a DNA marker capable of discriminating the gene type of rice cytoplasmic male sterility-restoring gene (Rf-1) at a DNA level, improving the efficiency of rice growth, and controlling the purity of seeds by using a primer having a specific base sequence and placed closely to the rice Rf-1.

SOLUTION: This DNA marker has a base sequence of formula I and boards at a place of 1 centimorgan (cM) closely to the rice Rf-1. The method for discriminating the gene type of the Rf-1 comprises preparing a pair of primers for detecting the DNA marker from a primer having the base sequence of formula II and a primer which is faced to the primer and has a continuous 15-40 base length base sequence selected from the 492 to 2371 bases in the base sequence of formula I, and subsequently subjecting a pair of the primers to a PCR using rice DNA as a template. When the DNA fragment originated from the DNA marker is amplified, it is judged that the DNA marker does not have the Rf-1. When the DNA is not amplified, it is judged that the DNA marker has the Rf-1.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-139465

(P2000-139465A)

(43) 公開日 平成12年5月23日 (2000.5.23)

(51) Int.Cl.⁷C 12 N 15/09
C 12 Q 1/68

識別記号

ZNA

F I

C 12 N 15/00
C 12 Q 1/68

デーマコード(参考)

Z NAA 4 B 0 2 4
Z 4 B 0 6 3

審査請求 未請求 請求項の数26 O.L. (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願平10-315985

(22) 出願日 平成10年11月6日 (1998.11.6)

(71) 出願人 000005887

三井化学株式会社

東京都千代田区霞が関三丁目2番5号

(72) 発明者 稲垣 明子

千葉県茂原市東郷1144番地 三井化学株式会社内

(72) 発明者 横畠 祐美

千葉県茂原市東郷1144番地 三井化学株式会社内

(72) 発明者 赤木 宏守

茨城県つくば市千現2-1-6 三井農業植物バイオ研究所内

最終頁に統く

(54) 【発明の名称】 イネの細胞質雄性不稔回復遺伝子近傍に位置するDNAマーカーおよびこれを用いた細胞質雄性不稔回復遺伝子の判別方法

(57) 【要約】

【課題】 イネの細胞質雄性不稔回復遺伝子 (Rf-1) の近傍に座乗するDNAマーカーを利用してRf-1の遺伝子型を識別し、細胞質雄性不稔性回復の能力の有無を簡便かつ確実に検定する方法を提供する。

【解決手段】 イネの稔性回復遺伝子近傍に位置するDNA配列を特定し、そのDNA配列を利用してDNAマーカーに由来するDNA断片を増幅させ、DNAマーカーの内のDNA塩基配列の違いを識別することによって、Rf-1に関する3種類の遺伝子型を識別し、細胞質雄性不稔回復能力の有無を判別する。

【効果】 DNAレベルでRf-1の遺伝子型が識別でき、それに細胞質雄性不稔性の回復能力を判別できるので、ハイブリッドライスおよびその親系統の育成を省力化できと共に、ハイブリッドライス種子の純度管理が可能になる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1で表される塩基配列を有し、イネの細胞質雄性不穏回復遺伝子（Rf-1）の近傍1センチモルガン（cM）の位置に座乗するDNAマーカー。

【請求項2】 配列表の配列番号2で表される塩基配列を有し、イネの細胞質雄性不穏回復遺伝子（Rf-1）の近傍1センチモルガン（cM）の位置に座乗するDNAマーカー。

【請求項3】 配列表の配列番号3で表される塩基配列を有するプライマーと、これと互いに向かい合うプライマーであって、配列番号1の492番から2371番より任意に選ばれる連続した15から40塩基の長さの塩基配列を有するプライマーとからなる、請求項1に記載のDNAマーカーを検出するための1組のプライマー。

【請求項4】 1組のプライマーの塩基配列が配列表の配列番号3と配列番号4で表される事を特徴とする請求項3に記載の1組のプライマー。

【請求項5】 配列表の配列番号6の塩基配列を有するプライマーと、これと、これと互いに向かい合うプライマーであって、配列表の配列番号2の1番から490番より任意に選ばれる連続した15から40塩基の長さの塩基配列を有するプライマーとからなる、請求項2に記載のDNAマーカーを検出するための1組のプライマー。

【請求項6】 1組のプライマーの塩基配列が配列番号5と配列番号6で表される事を特徴とする請求項5に記載の1組のプライマー。

【請求項7】 請求項3又は請求項4の何れか1項に記載の1組のプライマーを用いてイネのDNAを錆型としてPCRを行い、DNAマーカーに由来するDNA断片が増幅された場合にはRf-1を持たないと判定し、DNAマーカーに由来するDNA断片が増幅されない場合にはRf-1を持つと判定する、Rf-1の遺伝子型の識別方法。

【請求項8】 請求項5又は請求項6の何れか1項に記載の1組のプライマーを用いてイネのDNAを錆型としてPCRを行い、DNAマーカーに由来するDNA断片が増幅された場合にはRf-1を持つと判定し、DNAマーカーに由来するDNA断片が増幅されない場合にはRf-1を持たないと判定する、Rf-1の遺伝子型の識別方法。

【請求項9】 配列表の配列番号7又は配列番号8で示される塩基配列を有し、イネのRf-1の近傍3cMの位置に座乗するDNAマーカー。

【請求項10】 配列表の配列番号7の115番目の塩基又は配列表の配列番号8の115番目の塩基を挟んで互いに向かい合う2種のプライマーからなる請求項9に記載のDNAマーカーを検出するための1組のプライマー。

【請求項11】 プライマーの塩基配列が配列番号9と配列番号10で表される事を特徴とする請求項9に記載のDNAマーカーを検出するための1組のプライマー。

【請求項12】 プライマーの塩基配列が配列表の配列番号7の1番から115番と配列番号7の116番から615番より、それぞれ任意に選ばれる連続した15から40塩基の長さの塩基配列で表されることを特徴とする請求項9に記載のDNAマーカーを検出するための1組のプライマー。

【請求項13】 プライマーの塩基配列が配列表の配列番号8の1番から115番と配列番号8の116番から610番より、それぞれ任意に選ばれる連続した15から40塩基の長さの塩基配列で表されることを特徴とする請求項9に記載のDNAマーカーを検出するための1組のプライマー。

【請求項14】 請求項10から請求項13の何れか1項に記載の1組のプライマーを用いてイネから抽出したDNAを錆型としてPCRを行い、請求項9に記載のDNAマーカーに由来するDNA断片を増幅し、増幅されたDNA断片が制限酵素DdeIで切断された場合にはRf-1を持たないと判定し、切断されない場合にはRf-1を持つと判定する、Rf-1の遺伝子型の識別方法。

【請求項15】 配列表の配列番号11および配列番号12で表される塩基配列を有し、イネのRf-1の近傍5cMの位置に座乗するDNAマーカー。

【請求項16】 配列表の配列番号11の264番目の塩基又は配列表の配列番号12の264番目の塩基を挟んで互いに向かい合う2種のプライマーからなる請求項15に記載のDNAマーカーを検出するための1組のプライマー。

【請求項17】 プライマーの塩基配列が配列表の配列番号11の1番から264番と配列表の配列番号11の265番から576番より、それぞれ任意に選ばれる連続した15から40塩基の長さの塩基配列で表されることを特徴とする請求項16に記載の1組のプライマー。

【請求項18】 プライマーの塩基配列が配列表の配列番号12の1番から264番と配列表の配列番号12の265番から576番より、それぞれ任意に選ばれる連続した15から40塩基の長さの塩基配列で表されることを特徴とする請求項16に記載の1組のプライマー。

【請求項19】 プライマーの塩基配列が配列表の配列番号13と配列番号14で表される事を特徴とする請求項16に記載の1組のプライマー。

【請求項20】 請求項16から請求項19の何れか1項に記載の1組のプライマーを用いてイネから抽出したDNAを錆型としてPCRを行い、請求項15に記載のDNAマーカーに由来するDNA断片を増幅し、増幅されたDNA断片が制限酵素 HindIIIで切断された場合にはRf-1を持たないと判定し、切断されない場

合にはRf-1を持つと判定する、Rf-1の遺伝子型の識別方法。

【請求項21】 請求項1、請求項9又は請求項15に記載のDNAマーカーとイネのRf-1を挟んで逆方向に位置し、配列表の配列番号15又は配列番号16で表される塩基配列を有し、Rf-1から4cMの位置に座乗するDNAマーカー。

【請求項22】 配列表の配列番号15の106番目の塩基又は配列表の配列番号16の106番目の塩基を挟んで互いに向かい合う2種のプライマーからなる請求項21に記載のDNAマーカーを検出するための1組のプライマー。

【請求項23】 プライマーの塩基配列が配列表の配列番号15の1番から106番と配列番号15の107番から421番より、それぞれ任意に選ばれる連続した15から40塩基の長さの塩基配列を有する請求項21に記載のDNAマーカーを検出するための1組のプライマー。

【請求項24】 プライマーの塩基配列が配列表の配列番号16の1番から106番と配列番号16の107番から421番より、それぞれ任意に選ばれる連続した15から40塩基の長さの塩基配列を有する請求項21に記載のDNAマーカーを検出するための1組のプライマー。

【請求項25】 プライマーの塩基配列が配列表の配列番号17と配列番号18である事を特徴とする請求項22~24に記載の1組のプライマー。

【請求項26】 請求項22から請求項25の何れか1項に記載の1組のプライマーを用いてイネから抽出したDNAを鑄型としてPCRを行い、請求項21に記載のDNAマーカーに由来するDNA断片を增幅し、増幅されたDNA断片がPvuIIで切断された場合にはRf-1を持つと判定し、DNA断片が切断されない場合にはRf-1を持つないと判定する、Rf-1の遺伝子型の識別およびRf-1の有無の判別方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、イネ、特にハイブリッドライスおよびその親系統の育成または育成されたハイブリッドライス種子生産における種子純度および親系統の純度の管理に利用される細胞質雄性不稔回復遺伝子の判別方法に関し、更に詳しくは該判別方法に使用されるDNAマーカーに関する。

【0002】

【従来の技術】細胞質雄性不稔(CMS)とは、細胞質内のミトコンドリアゲノムにコードされる細胞質雄性不稔化因子によって正常な花粉が生産できなくなる現象である。このCMSは高等植物に広く見られる現象で、核と細胞質の遺伝子産物の不親和によって生じると考えられている。一方、細胞質雄性不稔回復遺伝子とは、核ゲ

ノムにコードされており、上記のCMSの因子を含む細胞質による花粉の不稔性を打ち消す機能を持つ。CMSは自分自身の花粉で稔実する事なく、大規模な交配によるハイブリッド種子の商業生産に利用する事ができる。また、細胞質雄性不稔回復遺伝子はハイブリッド植物での結実を可能とし、特に、ハイブリッドライスやハイブリッドコーンの様にハイブリッド植物に結実する種子を収穫する植物においては必須となる遺伝子である。従って、CMS化因子とそれを回復させる細胞質雄性不稔回復遺伝子は農業上極めて重要な遺伝子に挙げられている。

【0003】イネにおいては、野生種に栽培種を交配した場合や、インディカ種にジャボニカ種を交配した場合に、核と細胞質の不親和によってCMSが生じることが知られている。特に、インディカ種の1つであるChinsurah Boro I Iにジャボニカ種を交配した場合に生じるCMSはBT型として分類され、このBT型CMSを回復させる細胞質雄性不稔回復遺伝子はRf-1と呼ばれている。ハイブリッドライスを商業生産する方法として、上記のCMSと細胞質雄性不稔回復遺伝子を組み合わせた「三系法」が確立されている。「三系法」ではCMSの因子を含む細胞質を持つ細胞質雄性不稔系統とハイブリッドライスで稔性を回復させるための細胞質雄性不稔回復遺伝子を有する稔性回復系統を用いてハイブリッドライスを大規模生産する。

【0004】稔性回復系統としては細胞質雄性不稔回復遺伝子を有する事が必須となる。従来、この細胞質雄性不稔回復遺伝子の有無を判別するためには、まず、調査対象とする系統をCMSである細胞質雄性不稔系統と交配し、次に、得られた交配種子を播種して植物体を育成し、その植物の自殖種子の形成率を調査する必要があった。すなわち、この自殖種子の形成率が80%以上の場合に、稔性回復遺伝子を有すると判別していた。しかし、かかる方法では膨大な労力と時間を必要とするため、簡便でかつ確実に細胞質雄性不稔回復遺伝子の有無を判別方法の開発が望まれていた。しかしながら、現在のところ、この細胞質雄性不稔回復遺伝子の機能・構造はまったく不明で、これを直接同定する方法は存在していない。

【0005】ところで、本発明で言う細胞質雄性不稔回復遺伝子とはBT型のCMSを回復させるもので、イネの第10染色体に座乗するものを指す。本発明ではRf-1と省略して示す。従って、細胞質雄性不稔回復遺伝子を持つ場合の遺伝子型はRf-1で、一方、細胞質雄性不稔回復遺伝子を持たない場合の遺伝子型はrf-1で示される。この表記方法に従えば、細胞質雄性不稔回復遺伝子を持つイネの、遺伝子型はRf-1/Rf-1の優性ホモ型、これを持たないイネの遺伝子型はrf-1/rf-1の劣性ホモ型、これらのハイブリッド(F1)の遺伝子型はRf-1/rf-1のヘテロ型で示さ

れる。

【0006】近年、DNA解析技術の急速な進歩によって、DNAレベルで目的遺伝子または目的形質を判別する、いわゆるマーカー育種技術が開発されてきた。この技術では、目的遺伝子そのものもしくは目的遺伝子と近接して存在する塩基配列(DNAマーカー)を探索する。このDNAマーカーは目的とする遺伝子に近接しているほど育種への寄与度は高いが、実用的に育種に利用するためには、このDNAマーカーと目的遺伝子との距離が5cM(センチモルガン)以下である事が望ましく、さらに、育種をより効率化するためには1cM以内であることが望ましい。

【0007】イネにおいては精密なRFLP地図が作成されており、本発明の対象であるRf-1が座乗している第10染色体にも多数のRFLPマーカーがマップされていた。しかしながら、何れのRFLPマーカーがRf-1の近傍に位置するかは明らかではなかった。さらに、RFLPマーカーを用いた場合には、簡便な操作で判別を行うことは困難であった。そのため、PCRを用いて判定することが可能なDNAマーカーの開発が行われ、その結果、Rf-1と近接するDNA断片が見出され、さらに、このDNA断片有無をPCRによって判定する技術が開発された(特開平06-016162)。しかしながら、このDNAマーカーはRf-1を持つ場合にのみ増幅され、持たない場合には増幅されないため、優性ホモの遺伝子型(Rf-1/Rf-1)とヘテロの遺伝子型(Rf-1/rf-1)を識別する事は不可能であった。これに対して、Rf-1と近接するマイクロサテライトマーカーが開発され、優性ホモの遺伝子型(Rf-1/Rf-1)とヘテロの遺伝子型(Rf-1/rf-1)を識別する事は可能となった(特開平09-313187)。しかしながら、このマイクロサテライトマーカーを用いてもRf-1の有無を判別できないイネ系統が存在する事が明らかとなった。

【0008】さらに、Rf-1とDNAマーカーとの距離の推定においては、この遺伝子が生殖に強く関与するため、誤差が大きくなる。従って、より精度の高い判定を行うためには、Rf-1により近接する複数のDNAマーカーを用いる必要があった。また、Rf-1を挟む両側に位置するDNAマーカーを組み合せることにより、二重組換の生じる確率に比例して判定の精度は飛躍的に向上させることができる。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、DNAマーカーを用いて簡便、かつ高精度にRf-1の有無を判別する技術を提供することにある。

【0010】本発明は、イネのRf-1の近傍に座乗するDNAマーカーとそれらを増幅するためのプライマーを提供し、これらのDNAマーカーを利用してRf-1の有無を判別する方法、さらに、イネのRf-1の優性

ホモ型、劣性ホモ型、ヘテロ型の3種類の遺伝子型を識別する方法を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、Rf-1が座乗すると推測されるイネの第10染色体に座乗する複数のRFLPマーカーに着目し、これらの塩基配列を決定した。決定した塩基配列を元に設計したプライマーを用いて、Rf-1を持つ品種とこの遺伝子を持たない品種から、これらのRFLPマーカーに対応するDNA断片をPCRによって増幅した。それぞれの品種から増幅されたDNA断片の塩基配列には部分的な相違が見出された。本発明者らは、それぞれの品種から増幅したDNA断片の塩基配列の相違を利用してこれらのDNA断片を識別しうることを見出し、複数のDNAマーカーを開発した。

【0012】さらに、本発明者らは、開発した複数のDNAマーカーの中からRf-1に近接し、かつ、その両側に座乗するDNAマーカーを特定した。開発されたDNAマーカーをPCR法によって増幅し、DNAマーカーの増幅の有無もしくはDNAマーカーの制限酵素による切断パターンによって、Rf-1に関する優性ホモ型、劣性ホモ型、ヘテロ型の3種類の遺伝子型が識別でき、これによってイネのRf-1の有無を詳細かつ容易に判定できる。本発明者らは以上の知見に基づき本発明を完成した。

【0013】すなわち、本発明は以下のとおりである。

〔1〕 配列表の配列番号1で表される塩基配列を有し、イネの細胞質雄性不稔回復遺伝子(Rf-1)の近傍1センチモルガン(cM)の位置に座乗するDNAマーカー。

〔2〕 配列表の配列番号2で表される塩基配列を有し、イネの細胞質雄性不稔回復遺伝子(Rf-1)の近傍1センチモルガン(cM)の位置に座乗するDNAマーカー。

〔3〕 配列表の配列番号3で表される塩基配列を有するプライマーと、これと互いに向かいあうプライマーであって、配列番号1の492番から2371番より任意に選ばれる連続した15から40塩基の長さの塩基配列を有するプライマーとからなる、上記〔1〕に記載のDNAマーカーを検出するための1組のプライマー。

〔4〕 1組のプライマーの塩基配列が配列表の配列番号3と配列番号4で表される事を特徴とする上記〔3〕に記載の1組のプライマー。

〔5〕 配列表の配列番号6の塩基配列を有するプライマーと、これと、これと互いに向かいあうプライマーであって、配列表の配列番号2の1番から490番より任意に選ばれる連続した15から40塩基の長さの塩基配列を有するプライマーとからなる、上記〔2〕に記載のDNAマーカーを検出するための1組のプライマー。

〔6〕 1組のプライマーの塩基配列が配列番号5と配

列番号6で表される事を特徴とする上記[5]に記載の1組のプライマー。

[7] 上記[3]又は上記[4]の何れか1項に記載の1組のプライマーを用いてイネのDNAを錠型としてPCRを行い、DNAマーカーに由来するDNA断片が増幅された場合にはRf-1を持つないと判定し、DNAマーカーに由来するDNA断片が増幅されない場合にはRf-1を持つと判定する、Rf-1の遺伝子型の識別方法。

[8] 上記[5]又は上記[6]の何れか1項に記載の1組のプライマーを用いてイネのDNAを錠型としてPCRを行い、DNAマーカーに由来するDNA断片が増幅された場合にはRf-1を持つと判定し、DNAマーカーに由来するDNA断片が増幅されない場合にはRf-1を持つないと判定する、Rf-1の遺伝子型の識別方法。

[9] 配列表の配列番号7又は配列番号8で示される塩基配列を有し、イネのRf-1の近傍3cMの位置に座乗するDNAマーカー。

[10] 配列表の配列番号7の115番目の塩基又は配列表の配列番号8の115番目の塩基を挟んで互いに向かい合う2種のプライマーからなる上記[9]に記載のDNAマーカーを検出するための1組のプライマー。

[11] プライマーの塩基配列が配列番号9と配列番号10で表される事を特徴とする上記[9]に記載のDNAマーカーを検出するための1組のプライマー。

[12] プライマーの塩基配列が配列表の配列番号7の1番から115番と配列番号7の116番から615番より、それぞれ任意に選ばれる連続した15から40塩基の長さの塩基配列で表されることを特徴とする上記[9]に記載のDNAマーカーを検出するための1組のプライマー。

[13] プライマーの塩基配列が配列表の配列番号8の1番から115番と配列番号8の116番から610番より、それぞれ任意に選ばれる連続した15から40塩基の長さの塩基配列で表されることを特徴とする上記[9]に記載のDNAマーカーを検出するための1組のプライマー。

[14] 上記[10]から上記[13]の何れか1項に記載の1組のプライマーを用いてイネから抽出したDNAを錠型としてPCRを行い、上記[9]に記載のDNAマーカーに由来するDNA断片を増幅し、増幅されたDNA断片が制限酵素DdeIで切断された場合にはRf-1を持つないと判定し、切断されない場合にはRf-1を持つと判定する、Rf-1の遺伝子型の識別方法。

[15] 配列表の配列番号11および配列番号12で表される塩基配列を有し、イネのRf-1の近傍5cMの位置に座乗するDNAマーカー。

[16] 配列表の配列番号11の264番目の塩基又

は配列表の配列番号12の264番目の塩基を挟んで互いに向かい合う2種のプライマーからなる上記[15]に記載のDNAマーカーを検出するための1組のプライマー。

[17] プライマーの塩基配列が配列表の配列番号1の1番から264番と配列表の配列番号11の265番から576番より、それぞれ任意に選ばれる連続した15から40塩基の長さの塩基配列で表されることを特徴とする上記[16]に記載の1組のプライマー。

[18] プライマーの塩基配列が配列表の配列番号12の1番から264番と配列表の配列番号12の265番から576番より、それぞれ任意に選ばれる連続した15から40塩基の長さの塩基配列で表されることを特徴とする上記[16]に記載の1組のプライマー。

[19] プライマーの塩基配列が配列表の配列番号13と配列番号14で表される事を特徴とする上記[16]に記載の1組のプライマー。

[20] 上記[16]から上記[19]の何れか1項に記載の1組のプライマーを用いてイネから抽出したDNAを錠型としてPCRを行い、上記[15]に記載のDNAマーカーに由来するDNA断片を増幅し、増幅されたDNA断片が制限酵素 HindIIIで切断された場合にはRf-1を持つないと判定し、切断されない場合にはRf-1を持つと判定する、Rf-1の遺伝子型の識別方法。

[21] 上記[1]、上記[9]又は上記[15]に記載のDNAマーカーとイネのRf-1を挟んで逆方向に位置し、配列表の配列番号15又は配列番号16で表される塩基配列を有し、Rf-1から4cMの位置に座乗するDNAマーカー。

[22] 配列表の配列番号15の106番目の塩基又は配列表の配列番号16の106番目の塩基を挟んで互いに向かい合う2種のプライマーからなる上記[21]に記載のDNAマーカーを検出するための1組のプライマー。

[23] プライマーの塩基配列が配列表の配列番号15の1番から106番と配列番号15の107番から421番より、それぞれ任意に選ばれる連続した15から40塩基の長さの塩基配列を有する上記[21]に記載のDNAマーカーを検出するための1組のプライマー。

[24] プライマーの塩基配列が配列表の配列番号16の1番から106番と配列番号16の107番から421番より、それぞれ任意に選ばれる連続した15から40塩基の長さの塩基配列を有する上記[21]に記載のDNAマーカーを検出するための1組のプライマー。

[25] プライマーの塩基配列が配列表の配列番号17と配列番号18である事を特徴とする上記[22]～[24]に記載の1組のプライマー。

[26] 上記[22]から上記[25]の何れか1項に記載の1組のプライマーを用いてイネから抽出したD

DNAを錆型としてPCRを行い、上記[21]に記載のDNAマーカーに由来するDNA断片を増幅し、増幅されたDNA断片がPvuIIで切断された場合にはRf-1を持つと判定し、DNA断片が切断されない場合にはRf-1を持つないと判定する、Rf-1の遺伝子型の識別およびRf-1の有無の判別方法。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明で言うイネのRf-1のDNAマーカーとは、イネのRf-1の近傍に位置するDNA配列であり、イネ細胞中のDNA配列の存在を調べることにより間接的にRf-1のrf-1の遺伝子型を判別する事によって、Rf-1の有無を判別できるものを指す。

【0015】本発明のDNAマーカーは、Rf-1と1cMないし5cMの遺伝的距離に位置するものを指す。これらのDNAマーカーとRf-1との位置関係は分析に用いる個体の集団の種類や個体数によって変動することが知られている。本発明の場合、約300系統の分析によって遺伝的距離を算出しておき、上記の遺伝的距離が5cMの場合には1.3cM、3cMの場合には0.32cM、1cMの場合には0.18cMの標準誤差が含まれる。従って、本発明のDNAマーカーはRf-1と0.82cMないし6.3cMの距離に位置し、育種上有効な距離に位置する。また、本発明とは異なる集団を用いた場合にもこれらの遺伝的距離の変動が予想されるが、上記の範囲を大きくはずれることはない。従って、いかなる集団を用いた場合でも、これらのDNAマーカーは育種上有効に利用することができる。

【0016】本発明のイネのRf-1のDNAマーカーとしては、例えば配列番号1、配列番号2、配列番号7、配列番号8、配列番号11、配列番号12、配列番号15、或いは配列番号16に記載の塩基配列を有するDNAが挙げられる。

【0017】さらに、本発明のDNAマーカーの内、配列番号15および16で示されるものは、配列番号1、配列番号2、配列番号7、配列番号8、配列番号11および配列番号12とは、Rf-1を挟んで逆の位置に座乗している。従って、これらRf-1の両側に座乗するDNAマーカーを組み合わせて用いることにより、二重組換えの生じる確率に比例して判定の精度は飛躍的に向上させることができる。

【0018】次に、イネのRf-1のDNAマーカーの同定方法について説明する。まず、第10染色体に座乗するRFLPマーカーの塩基配列を決定する。決定した塩基配列を基にRFLPマーカーをPCRによって増幅するためのプライマーを合成する。合成したプライマーを用い、Rf-1を持つイネとこれを持たないイネから抽出したDNAを錆型としてPCRを行い、それぞれのイネのRFLPマーカーに対応するDNA断片を増幅する。次に、増幅されたDNA断片の塩基配列を決定す

る。塩基配列は増幅されたDNA断片を直接、あるいは、ベクターにクローニングして決定することができる。

【0019】例えば、配列番号1に示すRf-1を持つイネから増幅されたDNA断片と、配列番号2に示すRf-1を持たないイネから増幅されたDNA断片の塩基配列では、一部の塩基の置換や欠失が見られ、両者の配列は99.6%の相同性を示す。これらの塩基配列の違いを利用して、Rf-1とrf-1の遺伝子型を識別する事で、Rf-1を持つイネと持たないイネを識別する方法について説明する。DNAマーカーの塩基の相違の特徴により、以下のa)およびb)の2種類の方法で遺伝子型を識別することができる。

【0020】a) 塩基の置換を利用する

対立するDNAマーカーの間での1塩基の違いがあれば、PCRによってこれらを識別することができる。すなわち、異なる塩基をPCRで用いるプライマーの3'末端に位置させる。これによって、プライマーの3'末の塩基が対合できないDNAマーカーはPCRによって増幅されない。この時、DNAマーカーの塩基がAに対してプライマー側の塩基をGとした場合に、DNAマーカーの塩基がGに対してプライマー側の塩基をAとした場合に、また、DNAマーカーの塩基がCに対してプライマー側の塩基がCとした場合にDNAマーカーの増幅は殆ど見られず、最も高い効果が得られる。用いるプライマーとしてはこれらの条件を満たしていれば良いが、その長さとしては15から40mer程度の長さのものを用いることで、安定してPCRによる増幅が行える。

【0021】例えば、配列番号1で示されるDNAマーカーの491番の塩基はCであるが、配列番号2で示されるDNAマーカーではGに置換されている。配列番号1の配列のみを増幅するためには、491番目の塩基Cを3'端とするプライマー（例えば、475番から491番の配列を有する配列番号3で示されるプライマー）とこれと向かい合うプライマーを利用すればよい。一方、配列番号2の491番の塩基はGであるため、その相補鎖の塩基はCとなる。従って、配列番号2を特異的に増幅するためには、相補鎖に対応するプライマーを合成し、その3'端を491番目のCとする（例えば、配列番号2の相補鎖の508番から491番の配列を有する配列番号5で示されるプライマー）。これと向かい合うプライマーと組み合わせることで、配列番号1は増幅されず、配列番号2のみが増幅されることになる。ここで、配列番号1はRf-1を持つイネに特異的存在する、すなわち、Rf-1の遺伝子型を識別するDNAマーカー。一方、配列番号2はRf-1を持たないイネに特異的に存在する、すなわち、rf-1の遺伝子型を識別するDNAマーカーである。

【0022】例えば、イネ品種“コシヒカリ”および“IR8”から抽出したDNAを錆型とした、配列番号

3と配列番号4で示されるオリゴヌクレオチドを用いた場合には“コシヒカリ”由来のDNAを錆型とした場合にのみDNA断片が増幅される。一方、配列番号5と配列番号6で示されるオリゴヌクレオチドを用いた場合には“コシヒカリ”由来のDNAを錆型とした場合にのみDNA断片が増幅される。

【0023】次に、この様なDNAマーカーを用いたRf-1の有無を判別する方法について説明する。まず、イネからDNAを抽出するが、抽出するための組織としては根、葉、種子など植物体のあらゆる部分を利用して、また精米も用いることができる。DNAの抽出方法としてはどの様な方法も用いることができ、粗精製のDNAを用いることもできる。次に、抽出されたDNAを錆型としてDNAマーカーに由来するDNA断片をPCR法によって増幅する。DNA断片の増幅の有無を解析する。Rf-1の遺伝子型に特異的なDNAマーカーのみが増幅された場合にはRf-1をホモを持つと判定し、逆に、rf-1の遺伝子型に特異的なDNAマーカーのみが増幅された場合にはrf-1をホモを持つと判定する。さらに、何れのDNAマーカーも増幅された場合には、Rf-1とrf-1を合わせ持つ、ヘテロであると判定する。

【0024】b) 塩基の置換、欠失が制限酵素の認識配列内で生じた場合

塩基の置換、欠失が制限酵素の認識配列内で生じた場合、その部位は制限酵素で切断されなくなる。この様な例として、例えば、配列番号7の115番から119番のCTCAGで示されるDdeI認識配列は、配列番号8ではCTCの3塩基が欠失しているために配列番号8はDdeIで切断されない。あるいは、配列番号11の262番から267番で示されるAAGCTTはHindIIIの認識配列であるが、これに対応する配列番号12の262番から267番ではAATCTTと塩基の置換が生じ、HindIIIでは切断されない。さらに、配列番号16の106番から111番で示されるPvuIIの認識配列であるCAGCTGは、対応する配列番号15では106番目の塩基がTに置換されており、PvuIIでは切断されない。

【0025】これらの塩基の欠失、置換が生じた制限酵素認識配列を含むそれぞれの配列に対応したDNAマーカーをPCRによって増幅する。DNAマーカーを増幅するためのプライマーとして、DNAマーカーに含まれる制限酵素認識配列を挟み、かつ、互いに向かい合う2個のプライマーが必要である。プライマーの長さとしては15から40mer程度の長さのものを用いることで、安定してPCRによる増幅が行える。プライマーの配列は、例えば、配列番号7番の1番から115番および116番から615番、配列番号8番の1番から115番および116番から615番、配列番号11の1番から264番および265番から576番、配列番号1

2の1番から264番および265番から576番、配列番号15の1番から106番および107番から421番、配列番号16の1番から106番および107番から421番より任意に選ばれる連続する塩基によって決定される。

【0026】PCRによって増幅したDNAマーカーに由来するDNA断片を制限酵素で処理し、それらの切断の有無を調べることによって、Rf-1もしくはrf-1の何れの遺伝子型に対応するDNAマーカーに由来するDNA断片であるかを確認する。

【0027】例えば、配列番号9と配列番号10で示されるオリゴヌクレオチドを用い、イネ品種“コシヒカリ”から抽出したDNAを錆型とした場合には配列番号7の1番から386番が、“IR8”から抽出したDNAを錆型とした場合には配列番号7の1番から386番で示されるDNAマーカーに由来するDNA断片が増幅される。さらに、増幅されたDNA断片をDdeIで処理した場合、“コシヒカリ”から増幅されたDNA断片は切断され118bpと268bpの2つの断片として検出されるのに対し、“IR8”から増幅されたDNA断片は切断されず386bpの断片として検出される。

【0028】次に、DNAマーカーを用いたRf-1の有無を判別する方法について説明する。まず、イネからDNAを抽出するが、抽出するための組織としては根、葉、種子など植物体のあらゆる部分を利用でき、また精米も用いることができる。DNAの抽出方法としてはどの様な方法も用いることができ、粗精製のDNAを用いることもできる。次に、抽出されたDNAを錆型としてDNAマーカーをPCR法によって増幅する。さらに、増幅されたDNAマーカーを制限酵素で処理し、切断の有無を電気泳動等によって確認する。例えば、配列番号13と配列番号14で示されるオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いた場合、355bpのDNA断片が増幅される。このDNA断片が制限酵素HindIII処理によって160bpと195bpの断片に切断された場合はRf-1を持たないrf-1/rf-1の遺伝子型と判定し、切断されなかつた場合はRf-1/Rf-1の遺伝子型でRf-1を持つと判定する。さらに、HindIIIで処理後、355bpと160bpおよび195bpの3種類の断片が検出された場合には、遺伝子型はRf-1/rf-1のヘテロで、Rf-1を持つと判定する。この様に、2つの対立する遺伝子座を同時に検出することができるDNAマーカーを共優性のマーカーという。さらに、Rf-1を夾んでその両側に位置するDNAマーカー、例えば、配列番号1および配列番号2で示されるDNAマーカーと配列番号15および配列番号16で示されるDNAマーカーと組み合わせることによって、飛躍的にRf-1を有するイネを判別する精度が向上できる。

【0029】

【実施例】以下に本発明を実施例に基づき詳細に説明する。

【実施例1】Rf-1を持つイネ品種として、インディカ種の“IR8”を、これを持たないイネ品種としてジャボニカ種の“コシヒカリ”を用いた。これらの成葉から、Lichtenstein & Draper (1985) DNA cloning vol.3 Practical approach, pp. 67-119, IRL Press, Oxford) の方法に従い、CTAB法によってDNAを抽出した。抽出したDNAを錠型として、配列番号19と配列番号20で示される配列を持つオリゴヌクレオチドをプライマーとし、PCRによってDNAマーカーに由来するDNA断片を増幅した。PCRはGeneAmp 9600システム(ABI社)を使用して行った。反応液20μl中には10ng DNA, 0.5units AmpliTaq (ABI社), 4nmole dNTP, 4pmole プライマー(配列番号19), 4pmole プライマー(配列番号20), 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KC1, 1.5mM MgCl₂が含まれる。これに第1回目の反応液1μlを100μlの滅菌水で希釈したもの1μlを錠型として加えた。PCR条件は、95°Cで10秒間のディナーチャー、55°Cで30秒間のアニール、72°Cで30秒間の伸長反応を1サイクルとし、40サイクル反応させた。PCRプライマーとして配列番号21と配列番号23のDNA配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。さらに、第3回目の反応液には、20μl中には10ng DNA, 0.5units AmpliTaq (TAKARA社), 4nmole dNTP, 10pmole プライマー, 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KC1, 1.5mM MgCl₂が含まれる。これに第1回目の反応液1μlを100μlの滅菌水で希釈したもの1μlを錠型として加えた。PCR条件は、95°Cで10秒間のディナーチャー、55°Cで30秒間のアニール、72°Cで30秒間の伸長反応を1サイクルとし、40サイクル反応させた。PCRプライマーとして配列番号21と配列番号24のDNA配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。第3回目の反応液を0.8%アガロースで分画し、増幅された約2kbの増幅DNA断片をゲルから回収し、TAクローニングキット(In Vitrogen社)を用いプラスミドpCRT M1Iにサブクローニングし、得られたクローンの塩基配列を373S DNAシークエンサー(ABI社)を用いて決定した。“コシヒカリ”および“IR8”から増幅されたDNA断片の塩基配列は、それぞれ配列番号1の1番から418番および配列番号2の1番から1番から418番で示され、418個の塩基を含んでいた。これらの2品種に由来する塩基配列は同一であった。

【0030】【実施例2】実施例1で増幅したDNAマーカーの隣接領域をTAIL-PCR法によって増幅・クローニングした。実施例1で抽出した“コシヒカリ”および“IR8”的DNAを錠型として、以下に示す方法に従って、TAIL-PCRを実施した。第1回目のPCRはGeneAmp 9600システム(ABI社)を使用して行った。反応液20μl中には10ng DNA, 0.5units AmpliTaq (TAKARA社), 4nmole dNTP, 10pmole プライマー, 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KC1, 1.5mM MgCl₂が含まれる。PCR条件は、95°Cで10秒間のディナーチャー、55°Cで30秒間のアニール、72°Cで30秒間の伸長反応を1サイクルとし、40サイクル反応させた。PCRプライマーとして配列番号21と配列番号22のDNA配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。第2回目のPCR反応液には、20μl中に

は10ng DNA, 0.5units AmpliTaq (TAKARA社), 4nmole dNTP, 10pmole プライマー, 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KC1, 1.5mM MgCl₂が含まれる。これに第1回目の反応液1μlを100μlの滅菌水で希釈したもの1μlを錠型として加えた。PCR条件は、95°Cで10秒間のディナーチャー、55°Cで30秒間のアニール、72°Cで30秒間の伸長反応を1サイクルとし、40サイクル反応させた。PCRプライマーとして配列番号21と配列番号23のDNA配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。さらに、第3回目の反応液には、20μl中には10ng DNA, 0.5units AmpliTaq (TAKARA社), 4nmole dNTP, 10pmole プライマー, 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KC1, 1.5mM MgCl₂が含まれる。これに第1回目の反応液1μlを100μlの滅菌水で希釈したもの1μlを錠型として加えた。PCR条件は、95°Cで10秒間のディナーチャー、55°Cで30秒間のアニール、72°Cで30秒間の伸長反応を1サイクルとし、40サイクル反応させた。PCRプライマーとして配列番号21と配列番号24のDNA配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。第3回目の反応液を0.8%アガロースで分画し、増幅された約2kbの増幅DNA断片をゲルから回収し、TAクローニングキット(In Vitrogen社)を用いプラスミドpCRT M1Iにサブクローニングした。得られたクローンの塩基配列を373S DNAシークエンサー(ABI社)を用いて決定した。“コシヒカリ”由来のクローンには配列番号1の397番から2371番で示されるDNAマーカーが含まれていた。一方、“IR8”由来のクローンには配列番号2の397番から2374番で示されるDNAマーカーが含まれていた。

【0031】【実施例3】実施例1のイネ品種“コシヒカリ”および“IR8”から抽出したDNAを錠型として、配列番号25と配列番号26で示される配列を持つオリゴヌクレオチドをプライマーとし、PCRによってDNAマーカーに由来する断片DNAを増幅した。PCRはGeneAmp 9600システム(ABI社)を使用して行った。反応液20μl中には10ng DNA, 0.2units AmpliTaq (ABI社), 4nmole dNTP, 4pmole プライマー(配列番号25), 4pmole プライマー(配列番号26), 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KC1, 1.5mM MgCl₂が含まれる。PCR条件は、94°Cで10秒間のディナーチャー、55°Cで30秒間のアニール、72°Cで30秒間の伸長反応を1サイクルとし、35サイクル反応させた。反応液を1%アガロースゲルで分画した。“コシヒカリ”およ

び“IR8”のそれぞれから増幅されたDNA断片をゲルから回収し、TAクローニングキット（In Vitrogen社）を用いプラスミドpCRTMI Iにサブクローニングした。得られたクローンの塩基配列を373S DNAシークエンサー（ABI社）を用いて決定した。“コシヒカリ”由來のクローンには配列番号7で示される塩基配列を有するDNAマーカーが、一方、“IR8”由來のクローンには配列番号8で示される塩基配列を有するDNAマーカーが含まれていた。

【0032】[実施例4] 実施例1のイネ品種“コシヒカリ”および“IR8”から抽出したDNAを鏡型として、配列番号27と配列番号28で示される配列を持つオリゴヌクレオチドをプライマーとし、PCRによってDNAマーカーに由来するDNA断片を増幅した。PCRはGeneAmp 9600システム（ABI社）を使用して行った。反応液 $20\mu\text{l}$ 中には10ng DNA, 0.2 units Amp1iTaq (ABI社), 4nmol 1e dNTP, 4pmol 1e プライマー（配列番号27）, 4pmol 1e プライマー（配列番号28）, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KC1, 1.5mM MgCl₂が含まれる。PCR条件は、94°Cで10秒間のディネーチャー、55°Cで30秒間のアニール、72°Cで30秒間の伸長反応を1サイクルとし、35サイクル反応させた。反応液を1%アガロースゲルで分画した。“コシヒカリ”および“IR8”のそれぞれから増幅されたDNA断片をゲルから回収し、TAクローニングキット（In Vitrogen社）を用いプラスミドpCRTMI Iにサブクローニングした。得られたクローンの塩基配列を373S DNAシークエンサー（ABI社）を用いて決定した。“コシヒカリ”由來のクローンには配列番号11で示される塩基配列を有するDNAマーカーが、一方、“IR8”由來のクローンには配列番号12で示される塩基配列を有するDNAマーカーが含まれていた。

【0033】[実施例5] 実施例1のイネ品種“コシヒカリ”および“IR8”から抽出したDNAを鏡型として、配列番号17と配列番号18で示される配列を持つオリゴヌクレオチドをプライマーとし、PCRによってDNAマーカーに由来するDNA断片を増幅した。PCRはGeneAmp 9600システム（ABI社）を使用して行った。反応液 $20\mu\text{l}$ 中には10ng DNA, 0.2 units Amp1iTaq (ABI社), 4nmol 1e dNTP, 4pmol 1e プライマー（配列番号17）, 4pmol 1e プライマー（配列番号18）, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KC1, 1.5mM MgCl₂が含まれる。PCR条件は、94°Cで10秒間のディネーチャー、55°Cで30秒間のアニール、72°Cで30秒間の伸長反応を1サイクルとし、30サイクル反応させた。反応液を1%アガロースゲルで分画した。“コシヒカリ”およ

び“IR8”のそれぞれから増幅されたDNA断片をゲルから回収し、TAクローニングキット（In Vitrogen社）を用いプラスミドpCRTMI Iにサブクローニングした。得られたクローンの塩基配列を373S DNAシークエンサー（ABI社）を用いて決定した。“コシヒカリ”由來のクローンには配列番号15で示される塩基配列を有するDNAマーカーが、一方、“IR8”由來のクローンには配列番号16で示される塩基配列を有するDNAマーカーが含まれていた。

【0034】[実施例6] Rf-1を持つイネ品種として、“IR8”および“MHR18”を、これを持たないイネ品種として“コシヒカリ”および“MHA23”を用いた。さらに、“MHA23”に“MHR18”を交配して得たF1植物“MH2003”を用いた。ここで供試した“IR8”と“MHR18”的遺伝子型は優性ホモ型で（Rf-1/Rf-1），“コシヒカリ”および“MHA23”的遺伝子型は劣性ホモ型で（r f-1/r f-1），“MH2003”的遺伝子型はヘテロ型で（Rf-1/r f-1）となる。これらの成葉から、Lichtenstein & Draper ((1985) DNA cloning vol 1.3 Practical approach, pp. 67-119, IRL Press, Oxford) の方法に従い、CTAB法によってDNAを抽出した。抽出したDNAを鏡型として、配列番号3と配列番号4で示す配列を持つオリゴヌクレオチドを一組のプライマーとし、また、配列番号5と配列番号6で示される配列を持つオリゴヌクレオチドをもう一組のプライマーとし、PCRによって配列番号1または配列番号2で示すDNAマーカーに由来するDNA断片を増幅した。PCRはGeneAmp 9600システム（ABI社）を使用して行った。反応液 $20\mu\text{l}$ 中には10ng DNA, 0.2 units Amp1iTaq (ABI社), 4nmol 1e dNTP, 8pmol 1e プライマー, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KC1, 1.5mM MgCl₂が含まれる。PCR条件は、94°Cで10秒間のディネーチャー、60°Cで30秒間のアニール、72°Cで30秒間の伸長反応を1サイクルとし、30サイクル反応させた。反応液を1%アガロースゲルで分画した。配列番号3と配列番号4で示すプライマーを組み合わせた場合には、“コシヒカリ”、“MHA23”および“MH2003”からのみ306bpのDNA断片が増幅され、“IR8”と“MTR18”からはDNA断片は増幅されなかった。一方、配列番号5と配列番号6で示すプライマーを組み合わせた場合には、Rf-1を持つ“IR8”、“MTR18”および“MH2003”からのみ160bpのDNA断片が増幅され、Rf-1を持たない“コシヒカリ”および“MHA23”からDNA断片は増幅されなかった。すなわち、このDNAマーカーによってRf-1に関する優性ホモ型（Rf-1/Rf-1）、劣性ホモ型（r f-1/r f-1）およびヘテロ型（Rf-1

$/rf-1$ の 3 種類の遺伝子型が識別できることが明らかとなった。さらに、これによって何れのイネ品種が $Rf-1$ を持つか否かを判定できた。

【0035】[実施例7] 実施例6に記載の、“IR8”、“MHR18”、“コシヒカリ”、“MHA23”および“MH2003”から抽出したDNAをPCRの錆型として用い、DNAマーカーに由来するDNA断片を増幅した。抽出したDNAを錆型として、配列番号9と配列番号10で示す配列を持つオリゴヌクレオチドをプライマーとし、PCRによって配列番号7または配列番号8で示すDNAマーカーに由来するDNA断片を増幅した。PCRはGeneAmp 9600システム(ABI社)を使用して行った。反応液 $20\mu l$ 中には10ng DNA, 0.2 units AmpliTaq(ABI社), 4nmole dNTP, 4pmole primer(配列番号9), 4pmole primer(配列番号10), 10mM Tris-HCl(pH 8.3), 50mM KC1, 1.5mM MgCl₂が含まれる。PCR条件は、94°Cで10秒間のディニーチャー、55°Cで30秒間のアニール、72°Cで30秒間の伸長反応を1サイクルとし、35サイクル反応させた。増幅されたDNA断片を制限酵素DdeIで処理し、1%アガロースゲルで分画した。 $Rf-1$ を持たない“コシヒカリ”と“MHA23”では、118bpと268bpの2本の断片が検出され、 $Rf-1$ を持つ“IR8”と“MHR18”では386bpの断片が1本のみ検出された。また、ヘテロの遺伝子型を持つ“MH2003”では118bp、268bpおよび386bpの3本の断片が検出された。すなわち、このDNAマーカーによって $Rf-1$ に関する優性ホモ型($Rf-1/Rf-1$)、劣性ホモ型($r f-1/r f-1$)およびヘテロ型($Rf-1/r f-1$)の3種類の遺伝子型が識別できることが明らかとなった。さらに、これによって何れのイネ品種が $Rf-1$ を持つか否かを判定できた。

【0036】[実施例8] 実施例6に記載の、“IR8”、“MHR18”、“コシヒカリ”、“MHA23”および“MH2003”から抽出したDNAをPCRの錆型として用い、DNAマーカーに由来するDNA断片を増幅した。抽出したDNAを錆型として、配列番号17と配列番号18で示す配列を持つオリゴヌクレオチドをプライマーとし、PCRによって配列番号15または配列番号16で示すDNAマーカーを増幅した。PCRはGeneAmp 9600システム(ABI社)を使用して行った。反応液 $20\mu l$ 中には10ng DNA, 0.2 units AmpliTaq(ABI社), 4nmole dNTP, 4pmole プライマー(配列番号17), 4pmole プライマー(配列番号18), 10mM Tris-HCl(pH 8.3), 50mM KC1, 1.5mM MgCl₂が含

まれる。PCR条件は、94°Cで10秒間のディニーチャー、55°Cで30秒間のアニール、72°Cで30秒間の伸長反応を1サイクルとし、35サイクル反応させた。増幅されたDNA断片を制限酵素PvuIで処理し、1%アガロースゲルで分画した。 $Rf-1$ を持つ“IR8”と“MHR18”では108bpと313bpの2本の断片が検出され、 $Rf-1$ を持たない“コシヒカリ”と“MHA23”では421bpの断片が1本のみ検出された。また、ヘテロの遺伝子型を持つ“MH2003”では108bp、313bpおよび421bpの3本の断片が検出された。すなわち、このDNAマーカーによって $Rf-1$ に関する優性ホモ型($Rf-1/Rf-1$)、劣性ホモ型($r f-1/r f-1$)およびヘテロ型($Rf-1/r f-1$)の3種類の遺伝子型が識別できることが明らかとなった。さらに、これによって何れのイネ品種が $Rf-1$ を持つか否かを判定できた。

【0037】[実施例9] 配列番号1と配列番号2、配列番号7と配列番号8、配列番号11と配列番号12および配列番号15と配列番号16で示される、DNAマーカーと $Rf-1$ との遺伝的距離、並びに位置関係を決定した。 $Rf-1$ を持たないCMS系統である“MTC-10A”と $Rf-1$ を持つ“MTC-10R”を用いた。これらは、“台中65号”にインディカ種の“Chinsurah Boro II”を戻し交配して得られた準同質遺伝子系統である。“MTC-10A”を母親とし、これに“MTC-10R”を交配してF1植物を育成した。得られたF1の花粉を“MTC-10A”に交配し、300個体のB1F1植物を得た。“MTC-10A”はBT型の細胞質を有する配偶体型細胞質雄性不稔であるので、“MTC-10A”と“MTC-10R”的F1では遺伝子型 $Rf-1$ の花粉のみが正常に発達する。すなわち、F1の花粉を“MTC-10A”に戻し交配して得られるB1F1の遺伝子型は全て $Rf-1/r f-1$ のヘテロとなる。300個体の植物体からSteinerらの方法((1995) Nucleic Acid Research 13:2569-2570)に従って、DNAを粗抽出した。実施例6から実施例8に記載の方法で、PCRによってDNAマーカーを増幅し、各DNAマーカーのパターンを解析した。何れのDNAマーカーにおいても、解析した全ての個体で“MTC-10A”由来のパターンが検出された。一方、“MTC-10R”由来のパターンに関しては、配列番号1と配列番号2のDNAマーカーでは、300個体中3個体で“MTC-10R”由来のパターンが検出され無かった。同様に、配列番号7と配列番号8のDNAマーカーでは300個体中9個体、配列番号11と配列番号12のDNAマーカーでは300個体中15個体、配列番号15と配列番号16のDNAマーカーでは180個体中7個体で“MTC-10R”由来のパターンが検出され無かった。即ち、これら“MT

C-10R" 由來のパターンが検出されなかつた個体では、各DNAマーカーとRf-1との間で組換えが生じたことになる。これらの結果を元に、Kosambiの計算式((1944)Ann Eugen 12:172-175)によって、各DNAマーカーとRf-1との位置関係および遺伝的距離を算出した。配列番号1と配列番号2のDNAマーカーとRf-1との遺伝的距離は1.0cM±0.18cM、配列番号7と配列番号8のDNAマーカーとは3.0cM±0.32cM、配列番号11と配列番号12のDNAマーカーとは5.0cM±1.3cM、配列番号15と配列番号16のDNAマーカーとは3.9cM±1.48cMであることが明らかとなった。また、位置関係については、配列番号15と配列番号16のDNAマーカーが他のDNAマーカーとRf-1を挟んで逆側に位置することが明らかとなった。

配列番号：1

配列の長さ：2371

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源

生物名：Oryza sativa L.

株名：品種"コシヒカリ"

配列：

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------|
| CAAGCAGTTT | GTTTGAAAG | CAAATTGGG | GGATTATTAT | TTTTTGGTG | GGAAATTGA | 60 |
| GTAGGGATCT | GTAATAGCGG | AAAAAGGAGG | AGCTTCGGTG | GTGAATTGAG | GGGTTTCTC | 120 |
| CATGGTGGGG | AAGGAATTGG | TGGTGAGAAA | GAACGGCCC | GTGGACATCC | GCGAGATTGC | 180 |
| CGCCAAGGCG | ACGCTGAGGG | AGGTCCGGCA | GAATGGGCAC | ACCTACGTG | AGCTCCGCCG | 240 |
| TGTCCGCAAG | CGCGTCATCT | TCTTCTGCAC | CATCTGCCTC | ACCGAGTGCT | TCAGCGACAC | 300 |
| CGTGCCTGTT | GATCACCTGA | AGGGGAACCT | GCACCTCCGG | CGCTACGCGG | AGGCTAAGGT | 360 |
| CACGCTGTT | GGGCCATGC | CATGCCGTT | CAACGACGGC | GTGCTCTCT | TCAACAACTC | 420 |
| GCGCGAGAAG | GACCCAGCTC | TTGCTGGACT | CGAGCTCGCA | GAACACCAGA | GAGCTGGCTC | 480 |
| TGGTCCAGC | CAACGACACT | GAAGTGACTT | CGAGGTTGAG | AGATGATTCT | AGCTCTCGCA | 540 |
| ATGGCGAAA | AGGCACACGC | CGTGGTGAA | ATGCGCATGG | TAATGGTAGA | ACTGCTCTG | 600 |
| TATCTGAAGA | TCATGTGCTG | TCAAACCAA | GTGGAACCTGA | CGGTCCCCTC | GTATTCTTA | 660 |
| GTGTATTGCT | AAAGGATGTT | GTTTCGGATT | TGCCTGTGCA | TCTTTGGGA | TATGGAAATA | 720 |
| TTGCATACAG | GTTATGGAA | GCTAGCAAAG | GAAGTAAAAA | GATTAGCAAG | ATCTGGTGTG | 780 |
| CTTGGTAGG | ACAGGATGGC | TCCCATGGCT | TGGATGAGTG | TGACACCTAT | GAGCAATCTG | 840 |
| ACTTGCCAT | TGTCAACTTC | TCTTATACAA | TTGAGTTGGG | CAGGAAGTGG | TCTTCTGATG | 900 |
| ATCAGGACCT | TCCTATCTCT | GCTGGATCTT | TCTTCGTGAT | TGATGATGCT | GGACACCGTG | 960 |
| GAAAGAGAAG | AAAGAAGTC | TTTTCAGATC | AAGAACATC | TTCAGAGGAG | TCGAATGAGC | 1020 |
| AAAGCAGCTC | CGCCCATGAC | AATAGCCAAG | CTATCATAAC | AGGTTCCCCG | ACAGGTACTT | 1080 |
| CACACAATCT | TCAAGTTGGC | CTCTTATCCA | CCAAATCTAT | GAGGAGGGAG | TTGCGTAAGC | 1140 |
| AGAACGCGCT | TGCTGCTGAG | AAAGCTTGTG | ATATTGTGG | GCGACCAATG | CTTCTTGAAGA | 1200 |
| AGGATGTAGC | TACCTTGCTC | AACTGCAAGA | CAGGAATCT | AGCCTGCAGC | AGTAGAAACT | 1260 |
| CAAGCGGGGT | AAATTATTTC | AAACATTCTT | TGCCTTGCA | GTTCCTTAGT | ATTTCTTGA | 1320 |
| GATAGCAACG | CATGACATGC | TTAGCATTT | TCACAGATAA | ATAAATTAAA | GCAAACCTAA | 1380 |
| AAAATTAGGC | ATTTGACTAA | TTTCCATTCA | TTAGTATGG | TAACCTCTTC | ACTGTTGAA | 1440 |
| TGGAATTACA | GTTCTCACAA | ACCAGGGATT | CCAAACCGTA | TAATGCAAAG | TGGTTGAATT | 1500 |

【0038】

【発明の効果】本発明により、イネの細胞質雄性不稔回復遺伝子(Rf-1)の近傍に位置する複数の共優性のDNAマーカーが提供される。本発明の共優性のDNAマーカーをPCRによるRf-1の遺伝子型の識別に利用することで、イネのRf-1の表現形質である細胞質雄性不稔回復能の判別を簡便にしかも精度よく行うことが出来る。

【0039】この本発明の方法により稔性回復能力の有無を判別することが可能となり、ハイブリッドライスの親系統の育成が効率化される。さらに、ハイブリッドライス種子の純度管理が可能となる。

【0040】

【配列表】

【0041】

CATTTCAAGC AAAACATAGA CAGTGTATAG TTTCTTCTT AAAAATTGT AGTATTCTGC 1560
 TGCAACCTCC AATGACTTTG TACGGCTAA TTTGCAGGCA TTTCATTGT TTCACACTTC 1620
 TTGCTTGCTG CACTGGACTA TTTTATGCCA ATATGAGATG CTAGCAGACA AAATTGCAAG 1680
 CAAGGGAAAA AGCAATCGAG GAAGAAAGGC AAAAATGCA CCTAAGAAAA TAACATCCAT 1740
 CCTTGCCCCA GAATGCCAGG GTACTGGAAT CCATGTTGAG GGAGATGAAC TGGAAAACC 1800
 AACCATTTCT TTATCTGAGG TTCAGACTTC AGAGTGCTAT TCTTCGCTGC TACTTTCTT 1860
 TAACTGGACC TGCTTCAATT ATTTGTTGTG TTAAGTAATT GTCGACATCC TTAATTAG 1920
 ATCCGTATCG CAGATGTTTC GCTATAAGCT GAAAGCCATT GAAGCACACA AAGCATGGAT 1980
 GAAGAGCCCT GAGGTGCTTG AGAACTGTT CACTGGACTT CATTCCCTG CAGAGCAAAT 2040
 AGAGAACTCT GAGGTAGCTT CATAGGCTAG CATAATTAAT ACCCATTITG TTTTGGATTA 2100
 AACCGTGAT TGATCGAAC CACTTTTTG CAGGAGCAGG TGATTCCACT GAAGTCGGTT 2160
 GCTTCTATG CAGCTGACGG GTGAGATGTC CTGCTAAGGC CATGGACCGT GCCTCGTCGC 2220
 TGCCAGAAC GAGAGGGATT CTGCCAGGA CGTTGTAAT TTACTAGAGC AGCTGTAAT 2280
 AAGCTTGCTT GACGATACTG TTAGAGATGC TGACAGTGTG GTTCGCTTCG GTTTAGCCTG 2340
 TAATTGCGTT GTACCTATGT TTCTCACTGC T 2371

【0042】

配列番号：2

配列の長さ：2374

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：

生物名：Oryza sativa L.

株名：品種“IR8”

配列：

CAAGCAGTTT GGTTTGAAG CAAATTGGG GGATTATTAT TTTTTGGTG GGAAATTG 60
 GTAGGGATCT GTAATAGCGG AAAAAGGAGG AGCTTCGGTG GTGAATTGAG GGGGTTCTC 120
 CATGGTGGGG AAGGAATTGG TGGTGAGAA GAACGGCCCC GTGGACATCC GCGAGATTGC 180
 CGCCAAGGCG ACCTGAGGG AGGTCCGGCA GAATGGGCAC ACCTACGTT AGCTCCGCCG 240
 TGTCGGCAAG CGCGTCATCT TCTTCTGCAC CATCTGCCTC ACCGAGTGT TCAGCGACAC 300
 CGTGCTGTTT GATCACCTGA AGGGGAACCT GCACCTCCGG CGCTACGCCG AGGCTAAGGT 360
 CACGCTGTTG GGGCCATGC CATGGCGTT CAACGACGGC GTGCTCTTCTC TCAACAAC 420
 GCGCAGAAC GACCCAGCTC TTGCTGGACT CGAGCTCGCA GAACACCAGA GAGCTGGCTC 480
 TGGTCCAGC GAACGACACT GAAGTGAATT CGAGGTTGAG AGATGATTCT AGCTCTCGCA 540
 ATGGCGCAAAG AGGCACACGC CGTGGTCAA ATGCGCATGG TAATGGTAGA ACTGCTTCTG 600
 TATCTGAAGA TCATGTGCTG TCAAACAAA GTGGAACTGA CGGTCTCTC GTTATTCTCA 660
 GTGTATTGCT AAAGGATGTT GTTTCGGATT TGCCTGTGCA TCTTTGGGA TATGGAAATA 720
 TTGCATACAG GTTATGGAA GCTAGCAAAG GAAGTAAAAAA GATTAGCAAG ATCTGGTGTG 780
 CTTGGGTAGG ACAGGATGGC TCCCATGGCT TGGATGAGTG TGACACCTAT GAGCAATCTG 840
 ACTTGCCAT TGTCAACTTC TCTTATACAA TTGAGTTGGG CAGGAAGTGG TCTTCTGATG 900
 ATCAGGACCT TCCTATCTCT GCTGGATCTT TCTTCGATGAT TGATGATGCT GGACACCGTG 960
 GAAAGAGAAC AAAGAAGTC TTTTCAGATC AAGAACATC TTCAAGGAGG TCGAATGAGC 1020
 AAAGCAGCTC CGCCCATGAC AATAGCCAAG CTATCATAAC AGGTTCCCG ACAGGTACTT 1080
 CACACAATCT TCAAGTTGGC CTCTTATCCA CCAAATCTAT GAGGAGGGAG TTGCGTAAGC 1140
 AGAACGCGCT TGCTGCTGAG AAAGCTTGTG ATATTTGTGG GCCACCAATG CTTCTGAAA 1200
 AGGATGTAGC TACCTTGCTC AACTGCAAGA CAGGAAATCT AGCCTGCAGC AGTAGAAACT 1260
 CAAGCGGGGT AAGTTATTTC AAACATTCTT TGCCTTGCA GTTCTTAGT ATTCTTGAA 1320
 GATAGCAACG CATGACATGC TTAGCATTTTC TCACAGATAA ATAAATTAAA GCAAACCTAA 1380
 AAAATTAGGC ATTTGACTAA TTTCCATTCA TTAGTTATGG TAACTTCTTC ATTGTTGAA 1440

TGGAATTACA GTTCTCACAA ACCAGGGATT CCAAACCGTA TAATGCAAAG TGGTTGAATT 1500
 CATTCAAGC AAAACATAGA CAGTGTATAG TTTCTTCTTT AAAAATTGT AGTATTCTGC 1560
 TGCAACCTCC AATGACTTTG TACGGCTAAT TTTGCAGGCA TTTCATTGT TTCACACTTC 1620
 TTGCCTGTG CACTGGACTA TTTTACGCCA ATATGAGATG CTAGCAGACA AAATTGCAAG 1680
 CAAGGGAAAA AGCAATCGAG GAAGAAAGGC AAAAATGCA CCTAAGAAAA TAACATCCAT 1740
 CCTTGCCCA GAATGCCAGG GTACTGGAAT CCATGTTGAG GGAGATGAAC TGGAAAACC 1800
 AACCATTTCT TTATCTGAGG TTCAAGCTTC AGAGTGTAT TCTTCGCTGC TACTTTCTT 1860
 TAACTGGACCC TGCTTCAATT ATTTGTTGTG TTAAGTAATT GTCGACATCC TTAATTAG 1920
 ATCCATATCG CAGATGTTTC GCTATAAGCT GAAAGCCATT GAAGCACACA AAGCATGGAT 1980
 GAAGAGCCCT GAGGTGCTTG AGAACTGTT CACTGGACTT CATTCCCTG CAGAGCAAAT 2040
 AGAGAACTCT GAGGTAGCTT CATAGGCTAG CATAATTAA ACCCATTTG TTTGGATTA 2100
 AACGCGTGTAT TGATCGAACCC AACTCTTTG CAGGAGCAGG AGGTGATTCC ACTGAAGTCG 2160
 GTTGCCTTCT ATGCAGCTGA CGGGTGAGAT GTCCTGCTAA GGCCATGGAC CGTGCTCGT 2220
 CGCTGCCAGA AACGAGAGGG ATTCTGCCAG GGACGTTGTA AATTACTAG AGCAGCTGTA 2280
 AATAAGCTTG CTTGACGATA CTGTTAGAGA TGCTGACAGT GTAGTTGCT TCGGTTAGC 2340
 CTGTAATTGC GTTGTACCTA TGTTTCTCAC TGCT 2374

【0043】配列番号：3

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

TGGCTCTGGT TCCAGCC 17

【0044】配列番号：4

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CACACCAAGAT CTTGCTAATC 20

【0045】配列番号：5

配列番号：7

配列の長さ：615

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：

生物名：Oryza sativa L.

株名：品種”コシヒカリ”

配列：

GCAGGGTAG GATTGTATG GTTGGTGGGT GCTCATAGCC TCATCCTTG TTTAGACCAT 60
 TAATTCCCT CTGCTTGATC CAGTGTACAT CCATGGGTTA GGACAGATTA GTTACTCAGT 120
 TAATTAAGTG TGAGACTGGA AAAAATATC TGACGGCAGT TTTATAAGTT GAGTGATTGA 180
 ACTAGTGAA GTTCAGTTAA CTGTCACCGG CTGTTAGATT GGGATGGCAG ACTGTTCTGA 240
 GTCAAAATGA AGCTTTACT GTGCGTGGTT ACCAGGTGCA GTAAAATAT TTCAGATCTA 300
 ATCGCAGTAA AAAAATGTA GTACTATATG TTAAGACGAG ATTGGTCGGT CAAAATCTAT 360
 CTGGCCCTT ACATCTCCA AATGTTACCT CAGTTGCAGG TGGTAAAAAA AAATCACTCG 420

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

GGAGGCTAAG GTCACGCTGT TC 22

【0046】配列番号：6

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

GTCACCTCAG TGTGCGTC 18

【0047】

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| TTTCACGTGA | TGTCGGCAGA | TCATGGACCA | TGTCTCAAAT | GCTGAAACTC | TGAACAATCA | 480 |
| ACAAAAAAAT | CCAAACAGAT | GAGCTGTGCA | ACTGATAATT | GATCATCACA | CTATTGCAA | 540 |
| CTCATCTTCA | TGTAGATGGA | CTTCAATCCC | GAAGAAATAA | TGACAGCAA | ATGCTGCGAT | 600 |
| CTGAGAAAGG | GATGG | | | | | 615 |

【0048】

配列番号：8
 配列の長さ：610
 配列の型：核酸
 鎮の数：2本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：genomic DNA
 起源：
 生物名：Oryza sativa L.
 株名：品種"IR8"

配列：
 GCAGGGATAG GATTGTATG GTTGGTGGGT GCTCATAGCC TCATCCTTG TTTAGACCAT 60
 TAATTCCT CTGCTTGATC CAGTGTACAT CCATGGGTTA GGACAGATTA GTTAGTTAAT 120
 TAAGTGTGAG ACTGGAAAAA ATATCTGAC GGCAGTTTA TAAGTTGAGT GATTGAACTA 180
 GTGAAAGTTTC AGTTAACGT CAACGGCTGT AGATTTGGGA TGGCAGACTG TTCTGAGTCA 240
 AAATGAAGCT TTTACTGTGC GTGGTTACCA GGTGCAGTAA AATAATTCA GATCTAATCG 300
 CAGTAAAAAA ATGTTAGTACT ATATGTTAAG ACGAGATTGG TCGGTCAAAA TCTATCTGGC 360
 CCTTACATC TCCCAAATGT TACCTCAGTT GCAGGPGGTA AAAAAAAATC ACTCGTTCA 420
 CGTGATGTCG GCAGATCATG GACCATGTCT CAAATGCTGA AACTCTGAAC AATCAACAAA 480
 AAAATCCAAC CAGATGAGCT GTGCAACTGA TAATTGATCA TCACACTATT TGCAACTCAT 540
 CTTCATGTAG ATGGACTTCA ATCCCGAAGA AATAATGACA GCAAAATGCT GCGATCTGAG 600
 AAAGGGATGG 610

【0049】配列番号：9

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎮の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

GCAGGGATAG GATTGTATG GTTG 24

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎮の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

GAGGTAACAT TTGGGAGATG TAAAG 25

【0051】

【0050】配列番号：10

配列番号：11
 配列の長さ：576
 配列の型：核酸
 鎮の数：2本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：genomic DNA
 起源：
 生物名：Oryza sativa L.
 株名：品種"コシヒカリ"

配列：
 GCGGCCGCTC CGGGAAGTCG AGCGAGTAGA CGCCCCCTGAC GCCGTACCGCG TCGGCGAGCC 60
 GCAGCGCGT CTCTGGCGGT GTGAAGGACA GCCCCGTTCA CGTCGCGCGG CGCCGCCGT 120
 TGATCGTCAC CGGCGCCGTG CTCCGCAGCA GGTACGCCCTG CGTCACGTTG ATCGACGGAGT 180
 ACCTGAACGA TCCCTGTGGG TTCGGCCTCG CCGCTCCGGC ACTCAGGTTCA CACCTGCCA 240
 ATGCAAAAAA CCAAAACCCA AAAGCTTAAT GCGAATAATA CATCATTCCA CGTATTAAA 300

| | |
|--|-----|
| AAAATAATTT ATAGGTAAAA TTTTATAAT GTATTTAGC GACGTAATG TCAATGCTGA | 360 |
| GAAATAAACG ATAATACTTT AAATGAAGTT CTAAAATTAA AATTTGGCA TCGGTTGATG | 420 |
| TTGGATAAAG AAAACGATGG AGGCTAGTAA TTTTCTCT TTTTAAGTA TCTAGATTGT | 480 |
| CATATATTGA ATTTCAGT TTTTATCCC TTTGAGGACA ATCCAACATAT TATTTTCCT | 540 |
| TTCTATGTA AAAGGTTGAA CAACATATTC AAACAT | 576 |

【0052】

配列番号：12
 配列の長さ：576
 配列の型：核酸
 鎮の数：2本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：genomic DNA
 起源：

生物名：*Oryza sativa* L.
 株名：品種“IR8”

配列：

| | |
|---|-----|
| GCGCCGCGTC CGGGAAAGTCG AGCGAGTAGA CGCCCTGAC GCCGTACCGCG TCGCGAGCC | 60 |
| GCAGCGCGT CTCTGGCGGT GTGAAGGACA GCCCGTTAG CGTCGCGCG CGCCGCCGT | 120 |
| TGATCGTCAC CGGGCCCGTG CTCCGCAGCA GGTACGCTG CGTCACGTTG ATCGACGAGT | 180 |
| ACCTGAACGA TCCCTGTGGG TTGGCCTCG CCGCTCCGGC ACTCAGGTT CACCTGCCCA | 240 |
| ATGAAAAAAA CCAAAACCCA AAATCTTAAT GCGAATAATA CATCATTCCA CGTATTAA | 300 |
| AAAATAATTT ATAGGTAAAA TTTTATAAT GTATTTAGC GACGTAATG TCAATGCTGA | 360 |
| GAAATAAACG ATAATGCTTT AAATGAAGTT CTAAAATTAA AATTTGGCA TCGGTTGATG | 420 |
| TTGGATAAAG AAAACGATGG AGGCTAGTAA TTTTCTCT TTTTAAGTA TCCAGATTGT | 480 |
| CATATATTGA ATTTCAGT TTTTATCCC TTTGAGGACA ATCCAACATAT TATTTTCCT | 540 |
| TTCTATGTA AAAGGTTGAA CAACATATTC AAACAT | 576 |

【0053】配列番号：13

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎮の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

TCGACGAGTA CCTGAACGAT CC 22

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎮の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

TTGGATTGTC CTCAAAGGGA TG 22

【0055】

【0054】配列番号：14

配列番号：15

配列の長さ：421

配列の型：核酸

鎮の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：

生物名：*Oryza sativa* L.

株名：品種“コシヒカリ”

配列：

| | |
|---|-----|
| TGCTTGTGTC ACTATTGACT TGTAACATA AATGGTCTGT TCGTTGCAAC TTTTGTGCAG | 60 |
| CTGCGCAGTT GTAGCTGCTA CAGTGACTAT ATTGCTTCTA TGTTGTAGCT GCTGCTGCAG | 120 |
| CAAGCTGCAC CGAACAGGAT CAAAGTAAA CGACGAGGGC ATTTAGAAGG AGAGGAATTG | 180 |
| TATTGTTCC TGGTATTAA TTTTAAATT TGTGGTCGGA AGTTTCGGAA GAAAAAATGT | 240 |
| GCTCATGAGT GATTATTGGC TCTGAACACC AACCTCTCTT TTCGTTGATT CCTTCTGAAG | 300 |

TGTTGGGTGT TGGGACACGA TGCTGCCGCC GACACGACAC CGGGTCCAC AATAACTAA 360
 TCTACTCGCG ACACCTTCAT TGAACTCAT ATAATTATT AGAAAGTCCA TTAACACATC 420
 T 421

【0056】

配列番号：16
 配列の長さ：421
 配列の型：核酸
 鎖の数：2本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：genomic DNA
 起源：
 生物名：Oryza sativa L.
 株名：品種“IR8”
 配列：

TGCTTGATGC ACTATTGACT TGTAAACATA AATGGTCTGT TCGTTGCAAC TTTTGTGCAG 60
 CTGCGCAGTT GTAGCTGCTA CAGTGACTAT ATTGCTTCTA TGTTGCAGCT GCTGCTGCAG 120
 CAAGCTGCAC CGAACAGGAT CAAAGTAGA CGACGAGGGC ATTTAGAAGG AGAGGAATTG 180
 TATTGTTCC CGGTATTTAA TTTTAAATT TGTGGTCGGA AGTTTCGAA GAAAAAATGT 240
 GCTCATGAGT GATTATTGGC TCTGAACACC AACCTCTCTT TCGTTGATT CCTTCTGAAG 300
 TGTTGGGTGT TGGGACACGA TGCTGCCGCC GACACGACAC CGGGTCCAC AATAACTAA 360
 TCTACTCGCG ACACCTTCAT TGAACTCAT ATAATTATT AGAAAGTCCA TTAACACATC 420
 T 421

【0057】配列番号：17

配列の長さ：22
 配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 配列：
 AGATGTGTTA ATGGACTTTC TA 22

【0058】配列番号：18
 配列の長さ：22
 配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 配列：
 AGATGTGTTA ATGGACTTTC TA 22

【0059】配列番号：19
 配列の長さ：22
 配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 配列：
 CAAGCAGTT GGTTGAAAG CA 22

【0060】配列番号：20
 配列の長さ：22
 配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：
 AGTTGTTGAA GAAGAGCACG CC 22
 【0061】配列番号：21

配列の長さ：16
 配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 配列：
 AGWGNAGWAN CAWAGG 16

【0062】配列番号：22
 配列の長さ：22
 配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：
 CGTCATCTTC TTCTGCACCA TC 22
 【0063】配列番号：23

配列の長さ：22
 配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 配列：
 GGAGGCTAAG GTCAAGCTGT TC 22

【0064】配列番号：24

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CGCGGTGCTC TTCTTCAACA AC 22

【0065】配列番号：24

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

GCAGGGATAG GATTGTATG G 21

【0066】配列番号：25

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CCATCCCTTT CTCAGATCGC A 21

【0067】配列番号：26

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

GCGGCCGCTC CGGGAAGTCG 20

【0068】配列番号：27

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

ATGTTGAAT ATGTTGTTCA AGG 23

【0069】配列番号：28

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

TGCTTGATGC ACTATTGACT TG 22

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 CA20 EA04

HA11

4B063 QA01 QA05 QA11 QQ04 QQ42

QS16 QS25 QX10